

NOTAS

METODOS DE ANESTESIA Y TINCION
PARA EL TRABAJO TAXONOMICO DE ACTINIAS
(ANTHOZOA, ACTINIARIA)

Wolfgang B. Stotz

*Departamento de Investigaciones Marinas
Universidad del Norte - Coquimbo - Chile*

ABSTRACT

The results of several anaesthetics and their effects on the tissues of sea anemones are examined. Different staining techniques for histological sections of sea anemones are compared also, with special reference to taxonomic work by the use of internal structures.

Recibido para publicación, 1º Septiembre 1981.

INTRODUCCION

La taxonomía de las actinias está basada principalmente en caracteres de anatomía interna y en estructuras que sólo son evidentes en cortes histológicos. Para lograr visualizar y describir estas estructuras no existen métodos estandarizados, de modo que los investigadores antes de comenzar a estudiar la taxonomía del grupo, deben probar y elaborar una metodología de trabajo. Este hecho causa pérdida de tiempo y a veces el uso de procedimientos inadecuados, lo cual puede provocar interpretaciones falsas de estructuras y confusiones en las descripciones.

Tradicionalmente las actinias se han anestesiado antes de ser fijadas, ya que son animales que se contraen muy rápidamente ante estímulos externos. En el presente trabajo se considera como anestésico a la sustancia o proceso con el cual se logra una relajación del animal, de modo que al ser expuesto no reaccione al fijador. Esto permite obtener animales fijados en forma expandida, en los cuales se supone que las estructuras internas (como septos, filamentos, faringe, etc.) conservan la posición y forma que tienen en el animal vivo. Esta característica es importante para realizar una buena descripción morfológica. Las sustancias recomendadas para anestesiarse actinias son múltiples, ver por ejemplo ADAM & CZIHAK (1964) y PIECHOCKI (1966).

Un anestésico bueno debe, además de las condiciones ya mencionadas (fijación de animales expandidos), no ocasionar variaciones en las estructuras finas de las actinias tales como filamentos, laminillas mesogleales que soportan la musculatura, la musculatura, etc. En este sentido RIEMANN-ZURNECK (1969) manifiesta que el $MgSO_4$ destruye los tejidos no permitiendo un examen de estructuras epiteliales. Esta autora, en comunicación personal, recomienda en general no anestesiarse, ya que todas esas sustancias da-

ñarían los epitelios de las actinias. Es este un cuestionamiento serio al uso de los anestésicos que debe ser probado.

En el trabajo taxonómico de las actinias es importante diferenciar claramente la musculatura y la mesoglea, ya que la ubicación, forma y desarrollo de los músculos son caracteres taxonómicos importantes, no existiendo un método de tinción universalmente recomendado para el trabajo con cortes histológicos. De allí, que es necesario analizar varios métodos para elegir el mejor.

La presente nota tiene como objetivo interesar y ayudar a los investigadores en el estudio taxonómico de las actinias, proponiendo métodos de anestesia y tinción adecuados, mostrando sus resultados en algunas de las especies más comunes en el litoral chileno. Estos métodos también pueden ser adecuados para ser empleados en otros grupos de invertebrados, tales como anélidos y moluscos por ejemplo.

Material

El material usado para analizar las diferentes metodologías fueron individuos de las tres especies de actinias chilenas más comunes: *Phymactis clematis* (Drayton), *Antholoba achates* (Drayton) y *Anthothoe chilensis* (Lesson), provenientes del intermareal rocoso de Mehuín (Provincia de Valdivia).

Métodos de Anestesia

En el presente estudio se analizaron las siguientes sustancias químicas (a-g) y procesos con efectos físicos (h):

- a) Sales de Magnesio ($MgCl_2$, $MgSO_4$) en solución acuosa al 7-7,50/o. Los animales se pueden someter a diferentes tratamientos con esta solución. Una posibilidad es inyectarla en la cavidad gastrovascular a través de la boca. Otra es reemplazar gradualmente el agua de mar en que están los animales por diferentes volúmenes de solución, hasta dejarlos en solución pura. Los animales también se anestesian colocándolos en una mezcla de solución acuosa de sales de magnesio con agua de mar en proporción de 1:1.
- b) Solución acuosa de Cloruro de Magnesio al 330/o. Se agrega esta solución lentamente al agua de mar de la cubeta.
- c) Mentol o Alcanfor en cristales. Se colocan algunos cristales en la superficie del agua. Es mejor tapar el acuario para concentrar los vapores de ambas sustancias.
- d) Alcohol etílico de 60° a 95° saturado con Alcanfor. Se agregan algunas gotas de esta solución a la superficie del agua.
- e) Alcohol etílico de 5°. Se agrega gradualmente alcohol más concentrado al agua, para alcanzar una concentración final de 5°.
- f) Hidrato de Cloral en solución acuosa al 50/o. Esta solución se va agregando lentamente (en gotas) al agua.
- g) Gotas de formalina. Se agrega formalina pura (400/o) (2-4 gotas por cada 100 ml) al agua en que están los animales.

h) Congelamiento. Se hace descender la temperatura del agua de la cubeta a cerca de 0° C, evitando la formación de hielo.

Para comprobar los efectos de algunos anestésicos se comparan ejemplares anestesiados antes de la fijación con otros fijados directamente sin anestésicar. Este tratamiento se hizo paralelamente con ejemplares de las tres especies mencionadas. Los métodos de anestesia analizados fueron:

- MgCl₂ y MgSO₄ (70/o, 1:1), 16 horas.
- Alcanfor y Mentol en cristales, 16 horas.
- Alcanfor en Alcohol (solución saturada), 16 horas.
- Alcanfor y Mento!, 16 horas; posteriormente MgCl₂ y MgSO₄ (70/o, 1:1), 7 horas.
- Alcohol etílico de 50, 12 horas.
- Hidrato de Cloral, 2 1/2 y 4 horas.
- Gotas de formalina, 15 - 30 minutos.
- Congelación.

Los tiempos señalados en cada caso no son los ideales, son excesivos. Los animales se expusieron a cada anestésico por un mayor tiempo que el necesario, con el fin de que el efecto del anestésico sobre los tejidos, si es que había alguno, fuera más drástico y notorio. Todas estas actinias, tratadas con diversos anestésicos se fijaron en formalina al 100/o con agua de mar. Los animales no tratados con anestésicos fueron fijados de la misma forma. Después de una semana se lavó el material en agua corriente, colocándolo en alcohol etílico de 800/o. Los animales se incluyeron en parafina (punto de fusión de 58-60° C) y se hicieron cortes seriados de 5 micrones de grosor (con un micrótopo de Leitz). Los cortes se tiñeron: una serie con Rojo Nuclear Picro-indigocarmín, otra con Hemalumbre Anaranjado-Eosina y algunos con Azan de Heidenhain.

Método de tinción

En este trabajo, se analizaron las siguientes técnicas empleando cortes histológicos de las tres especies de actinias mencionadas:

- Azan de Heidenhain, ROMEIS (1948).
- Rojo Nuclear Picro-indigocarmín. Se modificó el procedimiento de ADAM & CZIHAK (1964), cambiando el colorante citoplasmático a 0,4 gr de indigocarmín en 100 cc de solución acuosa saturada de ácido pícrico (ROMEIS, párrafos 716 y 717, 1948).
- Fucsina básica Picro-indigocarmín, de acuerdo a los procedimientos de ROMEIS (op. cit.).
- Hemalumbre Picro-indigocarmín. Se usó Hemalumbre de Mayer (ROMEIS, op. cit.).
- Hemalumbres-Anaranjado-Eosina. Se usó Hemalumbre de Mayer (ROMEIS, op. cit.) y una solución de Anaranjado G y Eosina según ROMEIS (op. cit., párrafo 726).

Se dan mayores detalles sobre estos métodos en el Apéndice I.

Resultados obtenidos con los anestésicos

Se considera que se han obtenido buenos resultados con un determinado procedimiento de anestesia, cuando se logra fijar animales expandidos en forma semejante a como se encuentran en su medio natural (Fig. 1). Los mejores resultados se obtuvieron con las sales de magnesio al 70/o. Con mentol y alcanfor en cristales y con solución saturada de alcanfor en alcohol etílico también se obtuvieron buenos resultados, pero sólo en actinias de tamaño pequeño (diámetro de la columna 0,5 - 2 cm). El cloruro de magnesio al 330/o, alcohol de 50 y el hidrato de cloral al 50/o resultaron poco satisfactorios como anestésicos. El congelamiento es un método inadecuado, ya que la mayoría de los animales evertía la faringe, produciendo una deformación de la anatomía interna. Las gotas de formalina dan malos resultados, ya que las actinias se contraen completamente. Sin embargo tal contracción es de forma aparentemente más natural y no tan forzada como cuando se colocaban las actinias directamente en el fijador.

Ninguno de los procedimientos de anestesia estudiados se puede considerar estandar para todas las especies o para una de ellas en particular. En el proceso influyen una serie de factores, de los cuales pudieron reconocerse sólo algunos. Entre éstos se pueden citar los siguientes: condiciones de los animales antes de comenzar la anestesia, iluminación a la cual están expuestos durante ella, temperatura del agua o del anestésico, concentración de éste y el tamaño de los animales. Si bien, más adelante se recomiendan algunas medidas considerando la influencia de estos factores, no se puede todavía predecir con certeza el resultado de un determinado método. Pero se pueden hacer algunas generalizaciones en base a lo observado en las tres especies estudiadas.

Las siguientes recomendaciones son de utilidad general para favorecer el proceso de anestesia y así lograr animales fijados de forma expandida:

- a) Antes de comenzar la anestesia dejar a los animales por algún tiempo fuera del agua, como recomienda PAX (en PIECHOCKI, 1966) o dejarlos en un pequeño volumen de agua tibia y mal oxigenada. Al colocar luego los animales en agua fresca, por lo general se expanden bien y reaccionan positivamente a la anestesia.
- b) Los animales deben ser tratados inmediatamente después de que se traen del terreno. Las actinias que han estado por algún tiempo en acuarios (por varios días), por lo general se expanden mal y reaccionan negativamente a la anestesia.
- c) Conviene dejar a los animales anestesiando durante la noche o en lugares oscuros. Muchas actinias se expanden mejor en esas condiciones, como manifiesta DELPHY (en PIECHOCKI, 1966).
- d) El agua o la mezcla con el anestésico en la cual se colocan los animales deben tener una temperatura baja (10° C o menos). En agua tibia las actinias por lo general se expanden mal.
- e) El anestésico actúa mejor si se concentra lentamente. Los animales colocados en anestésico muy concentrado por lo general se contraen.

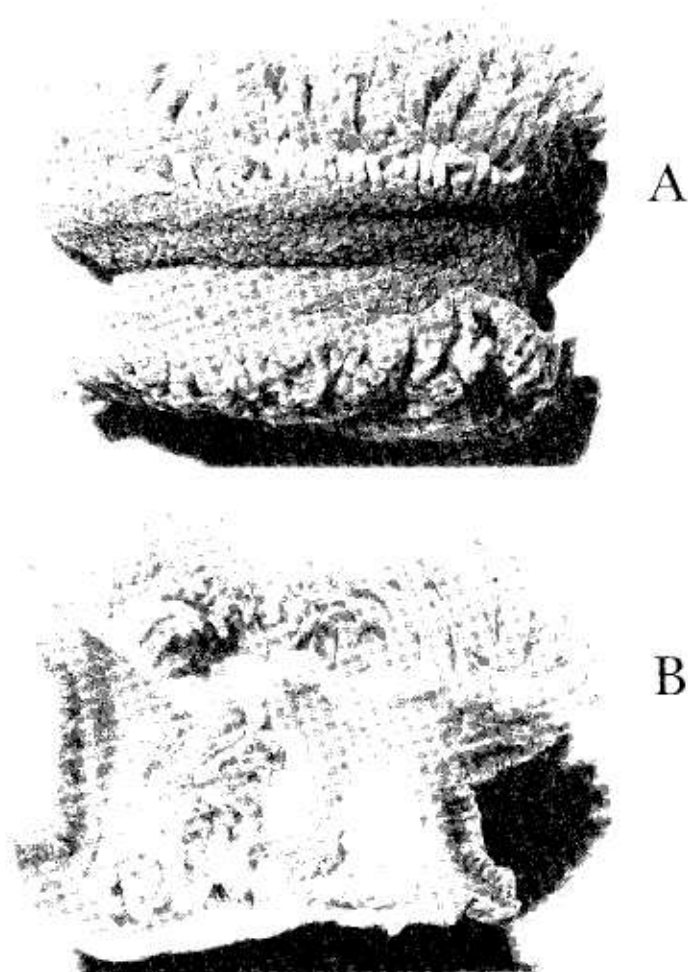


Figura 1. A) *Phymactis clematis* fijada de forma extendida.
B) Anatomía interna del mismo individuo mostrado en A).

f) No todos los anestésicos actúan con la misma rapidez. Por ejemplo el Mentol y Alcanfor tienen una acción más lenta que las sales de Magnesio. Se logra una profundización gradual de la anestesia mediante una combinación de dos anestésicos, primero uno de acción lenta, luego uno de acción rápida. Una muy buena combinación de este tipo resulta usando Mentol o Alcanfor (en cristales o como solución saturada de alcohol), agregando posteriormente soluciones de sales de Magnesio al 70/o.

g) Los animales grandes se anestesian más lentamente y requieren de concentraciones más elevadas de anestésico o anestésicos más fuertes que los animales pequeños. En general, conviene someter a los animales grandes a una combinación de anestésicos.

h) El tiempo que demora cada método de anestesia es muy variable, por lo que el proceso debe ser controlado en cada caso. Se controla mediante estimulación mecánica; por ejemplo pinchando con un alfiler un tentáculo. Cuando éste no reaccione, conviene anestésicar todavía un rato más (30 minutos a una hora) antes de fijar. Sólo al usar hidrato de cloral es necesario fijar de inmediato ya que una exposición muy prolongada puede producir una maceración de los tejidos, como señala ADAM & CZIHAK (1964).

Los anestésicos aparentemente no afectan los tejidos de las actinias. El análisis microscópico de epitelios y estructuras necesarias para el trabajo taxonómico en los cortes histológicos mostró, además de que el material tratado con diferentes anestésicos no difiere entre sí, que no existe diferencia alguna entre los animales fijados directamente (usados como control) y los tratados con anestésicos previo a la fijación. De acuerdo a este análisis se concluye que la anestesia no produce daños a ese nivel, no siendo entonces un causante de dificultades en el trabajo taxonómico de las actinias.

Se recomienda entonces la anestesia, ya que mediante ella se logran fijar animales expandidos, lo cual facilita la observación y contribuye así a reducir las posibilidades de error por falsa interpretación de cortes. Sin embargo, el nivel de examen usado no permitió ver si los anestésicos afectan la estructura fina de los tejidos (tipos o formas de células), las cuales pudieran usarse en taxonomía, y de acuerdo a RIEMANN-ZURNECK (1969) serían afectadas. Teniendo en cuenta eso se recomienda conservar también algunos especímenes fijados directamente. Los animales anestesiados sólo son necesarios para estudiar la morfología a nivel macroscópico, como ser, número, ubicación y forma de septos, distribución de los distintos tipos de filamentos, ubicación de estomas, etc. (Fig. 2). Para el trabajo a nivel microscópico la anestesia es de ayuda para ubicarse en los cortes histológicos, pero no es indispensable. Las estructuras también se logran identificar bien en especímenes fijados directamente, sin anestesia previa (Fig. 3).

Resultados obtenidos con las tinciones

Una tinción se considera buena cuando diferencia bien en las actinias la musculatura y la mesoglea y hace evidente la mayor cantidad de estructuras (tipos de glándulas, nematocistos, etc.) en los demás tejidos. Las técnicas analizadas en este trabajo dieron los siguientes resultados:

a) Azan de Heidenhain. Los resultados logrados con esta tinción fueron distintos a los previstos. Se esperaba una tinción azul para la mesoglea y rosado o naranja para la musculatura. Pero ellas por lo general se tiñeron de un color entre rosado y azul, no diferenciándose claramente del resto de los tejidos. Se ignoran las causas de estos resultados. El hecho de que el material fue fijado en formalina puede haber influido, siendo la tinción recomendada por ADAM & CZIHAK (1964) para materiales tratados con fijadores que contengan sublimado. RIEMANN-ZURNECK (1969, 1973) recomienda esta tinción para las actinias por su clara resolución y ha obtenido buenos resultados en sus cortes de actinia, incluso usando material fijado en formalina.

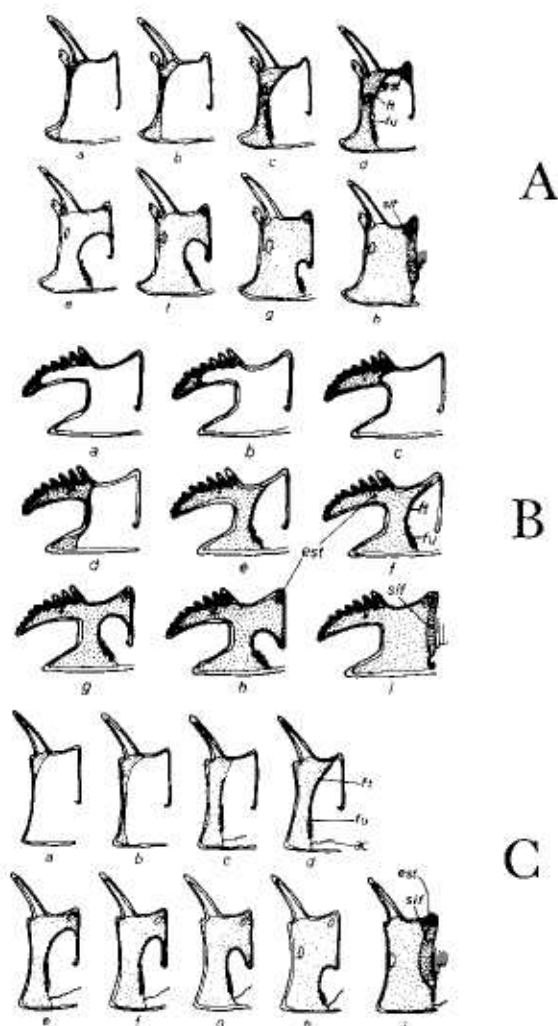


Figura 2. Formas de septos de (A) *Phymactis clematis*, (B) *Antholoba achates* y (C) *Anthothoe chilensis*.

ac = aconcio; est = estoma; ft = filamento trilobado; fu = filamento unilobado; sif = sifonoglifo.

b) Rojo Nuclear Picro-indigocarmín. Con esta técnica se logró una tinción muy constante y adecuada para los cortes de actinia. La musculatura de color verde se diferenció claramente de la mesoglea de color azul. Esto permite identificar incluso los grupos de fibras musculares muy débiles. Los epitelios se tiñen de diversas tonalidades de verde, azul, rojo, naranja y los núcleos de rojo. Este procedimiento tiene además la ventaja de que se realiza en poco tiempo (aproximadamente 75 minutos, incluyendo desde la desparafinación hasta el montaje) y demanda sólo pequeñas cantidades de reactivos.

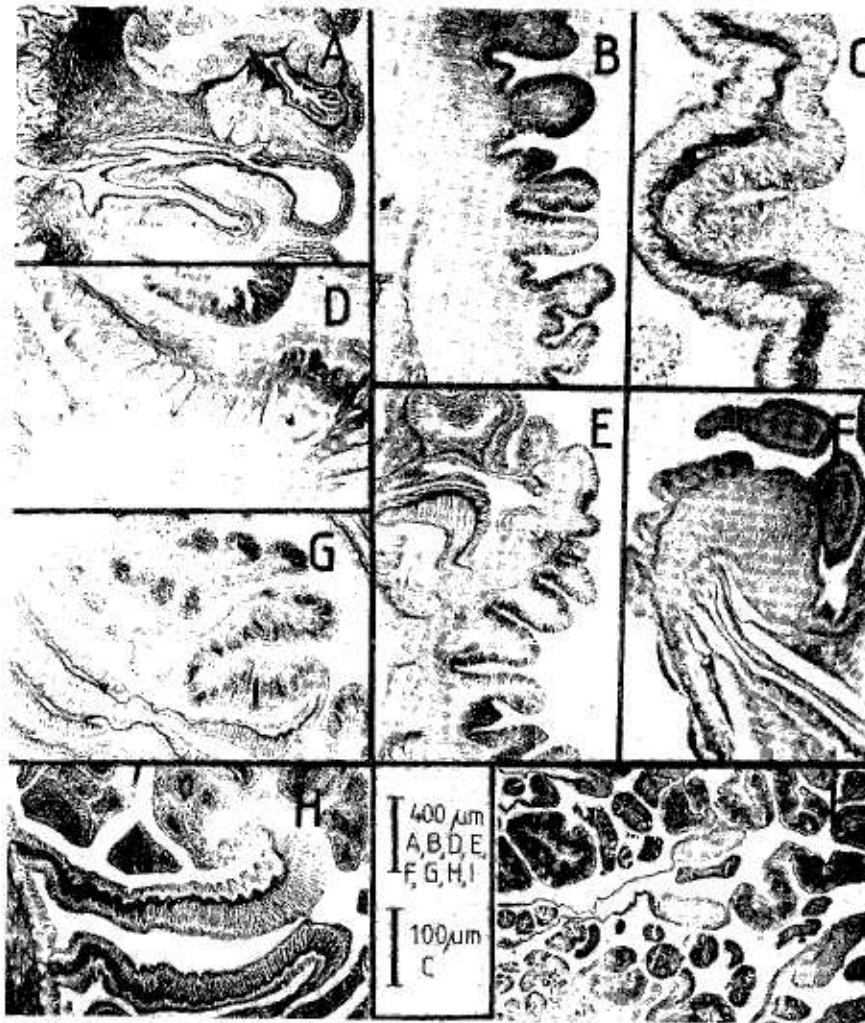


Figura 3. Corte longitudinal de columna de (A) *P. clematis*, (B) *A. achates* y (C) *A. chilensis*; Esfínter en corte longitudinal de (D) *P. clematis*, (E) *A. achates* y (F) *A. chilensis*; septos en corte transversal de (G) *P. clematis*, (H) *A. achates* e (I) *A. chilensis*.

c) Fucsina básica Picro-indigocarmín. Esta tinción es usada por HAND (1974) para cortes de actinia. La tinción tiene resultados muy similares a los logrados con Rojo Nuclear Picro-indigocarmín, pero son poco constantes. Por esta razón es un procedimiento no recomendable al tener que teñir simultáneamente un gran número de cortes.

d) Hemalumbre Picro-indigocarmín. Los resultados de este procedimiento son inferiores a los logrados con Rojo Nuclear Picro-indigocarmín. No logra una diferenciación clara de la musculatura y mesoglea.

e) Hemalumbre-Anaranjado-Eosina. Esta tinción resultó inadecuada para los cortes de actinia. La musculatura y la mesoglea se tiñen del mismo color, lo cual dificulta una identificación clara de cada una de estas estructuras.

RESUMEN

Se examinan los resultados de diversos anestésicos y sus efectos sobre los tejidos de actinias. También se comparan algunas técnicas de tinción para cortes histológicos de actinia, con especial atención al trabajo taxonómico en base a las estructuras internas.

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus sinceros agradecimientos al Lic. Ramón Formas del Instituto de Zoología de la Universidad Austral de Chile por sus valiosas sugerencias durante la preparación del manuscrito y al Dr. Carlos A. Viviani por la revisión crítica del mismo. A la Dirección de Investigaciones de la Universidad Austral de Chile, cuyo aporte financiero en base al proyecto de investigación C-24 hizo posible la realización de este trabajo.

APENDICE I

TÉCNICAS DE TINCION

a) Azan de Heidenhain.

Tinción nuclear y del citoplasma basófilo con Azocarmín G a 56-60° C por 20-60 minutos.

Diferenciar en alcohol anilina al 0,10/o hasta que se aprecien bien los núcleos.

Interrumpir diferenciación en alcohol ácido acético manteniendo ahí por un minuto.

Decolorar el tejido conectivo en ácido fosfotúngstico 50/o (solución acuosa) por 15 minutos a 3 horas (hasta que esté totalmente decolorado).

Lavar en agua destilada y teñir por 3-20 minutos en Orange -G- Azul de anilina.

Lavar en agua destilada y diferenciar en alcohol de 960/o, cambiando varias veces el alcohol.

Deshidratar en alcohol absoluto, impregnar con Xilol y montar en bálsamo.

Preparación de los reactivos:

Azocarmín G: 0,1 gr de reactivo en 100 ml de agua destilada, hervir corto y filtrar, luego agregar 1 ml de ácido acético glacial.

Alcohol anilina: 0,1 ml de aceite de anilina en 100 ml de alcohol de 90°.

Alcohol ácido acético: 1 ml ac. acético en 100 ml alcohol de 96°.

Orange G Azul de anilina: 0,5 gr de Anilina 2 gr de Orange G en 100 ml de agua destilada, agregando 8 ml de ácido acético glacial; hervir corto y filtrar después de enfriado. Esta solución madre se diluye con agua destilada en proporción de 1:1 a 1:3 para teñir.

b) Rojo Nuclear Picro-indigocarmín:

Tinción nuclear en rojo nuclear por 10-30 minutos. Lavar en agua destilada y teñir en Picro-indigocarmín por 20-30 segundos.

Deshidratar en alcohol 96^o, absoluto, impregnar y montar.

Preparación de los reactivos:

Rojo nuclear: 0,1 gr rojo nuclear en solución acuosa al 5^o/o de sulfato de aluminio, calentar, hasta hervir, filtrar una vez enfriado.

Picro-indigocarmín: 0,4 gr de indigocarmín en 100 ml solución acuosa saturada de ácido pícrico.

c) Fucsina básica Picro-indigocarmín:

Teñir los cortes 1-10 minutos en Fucsina básica. Lavar en agua destilada y teñir en Picro-indigocarmín.

BIBLIOGRAFIA

- ADAM, H. & CZIHAK, G., 1964. Arbeitsmethoden der makroskopischen und mikroskopischen Anatomie. Gustav Fischer Verlag Stuttgart, R.F.A. 583 págs.
- HAND, C., 1974. A Description of the Sea Anemone *Halcampa crypta*, new species. *Wasman Journ. Biol.*, 32 (2): 327-336.
- PIECHOCKI, R., 1966. Makroskopische Präparationstechnik. Teil II, Wirbellose. Akademische Verlagsgesellschaft Geest & Porting K.-G. Leipzig, DDR 339 págs.
- RIEMANN-ZURNECK, K., 1969. *Sagartia troglodytes* (Anthozoa) Biologie und Morphologie einer schlickbewohnenden Aktinie. *Veroff. Inst. Meeresforsch. Bremerhaven*, 12: 169-230.
1973. Actiniaria des Sudwestatlantik. I. Hormathiidae. *Helgolander wiss. Meeresunters.* 25: 273-325.
- ROMEIS, B., 1948. Mikroskopische Technik. R. Oldenburg Munchen. R.F.A. 695 págs.